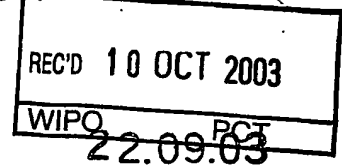


10/528773  
Rec'd PCT/PTO 23 MAR 2005  
PCT/IP 03/12087



日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 2 年   9 月 2 4 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 2 - 2 7 7 8 7 3  
Application Number:  
[ST. 10/C]:            [ J P 2 0 0 2 - 2 7 7 8 7 3 ]

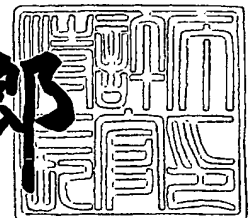
出      願      人            昭 和 電 工 株 式 会 社  
Applicant(s):

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 3 年   7 月   9 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田信一郎



【書類名】 特許願

【整理番号】 11H140307

【あて先】 特許庁長官殿

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター

【氏名】 米田 正

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター

【氏名】 北國 英一

【発明者】

【住所又は居所】 千葉県千葉市緑区大野台一丁目1番1号 昭和電工株式会社 研究開発センター

【氏名】 古谷 和男

【特許出願人】

【識別番号】 000002004

【氏名又は名称】 昭和電工株式会社

【代表者】 大橋 光夫

【代理人】

【識別番号】 100118740

【弁理士】

【氏名又は名称】 柿沼 伸司

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 010227

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0102656

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 アイチュリンAおよびその同族体の製造法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 アイチュリンAおよびその同族体生産能を有するバチルス (Bacillus) 属微生物を大豆粉またはその抽出物を2質量%以上含む液体培地で培養し、培養液中に1.5 g/L以上の濃度でアイチュリンAおよびその同族体を蓄積させることを特徴とするアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【請求項2】 アイチュリンAおよびその同族体生産能を有するバチルス (Bacillus) 属微生物が、1.5 g/L以上のアイチュリンAおよびその同族体を含有する培地中で生育可能なバチルス (Bacillus) 属微生物であることを特徴とする請求項1に記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【請求項3】 アイチュリンAおよびその同族体生産能を有するバチルス (Bacillus) 属微生物が、アイチュリンAおよびその同族体生産能を有しサーファクチン生産能を実質的に有さないバチルス (Bacillus) 属微生物であることを特徴とする請求項1または2に記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【請求項4】 液体培地が、リン酸塩の添加量を $K_2HPO_4$ 換算で0~3質量%以下にした液体培地であることを特徴とする請求項1~3のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【請求項5】 バチルス属微生物がバチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) である請求項1~4のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【請求項6】 バチルス属微生物がバチルス・ズブチリス SD142 (FERM P-19032) である請求項1~4のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【請求項7】 バチルス属微生物がバチルス・ズブチリス SD142 (FERM P-19032) の変異株である請求項1~4のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【請求項 8】 大豆粉またはその抽出物を 2 質量%以上含む液体培地がマルトース、水飴、可溶性デンプン、デキストリン、グルコース、ショ糖、フルクトースからなる群より選ばれる一種以上を含むものである請求項 1～7 のいずれかに記載のアイチュリン A およびその同族体の製造法。

【請求項 9】 請求項 1～8 のいずれかに記載の方法で培養液中にアイチュリン A およびその同族体を蓄積させたアイチュリン A およびその同族体含有培養物。

【請求項 10】 請求項 9 に記載のアイチュリン A およびその同族体含有培養物を乾燥したアイチュリン A およびその同族体含有固形物。

【請求項 11】 請求項 9 または 10 に記載のアイチュリン A およびその同族体含有培養物あるいは固形物を使用することを特徴とする植物病害防除剤。

【請求項 12】 請求項 9 または 10 に記載のアイチュリン A およびその同族体含有培養物あるいは固形物を精製せずに使用することを特徴とする植物病害防除方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、大豆あるいはその抽出物を窒素源として含む液体培地でバチルス属微生物を培養し、培養液中に高濃度のアイチュリン A およびその同族体を蓄積させるアイチュリン A およびその同族体の製造方法に関する。また、製造されたアイチュリン A およびその同族体含有培養物、それを乾燥したアイチュリン A およびその同族体含有固形物、それらの応用方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

バチルス (*Bacillus*) 属微生物、特にバチルス・ズブチリス (*Bacillus subtilis*) がアイチュリン A およびその同族体を生産することが、従来より知られている (例えば、非特許文献 1 参照。 )。

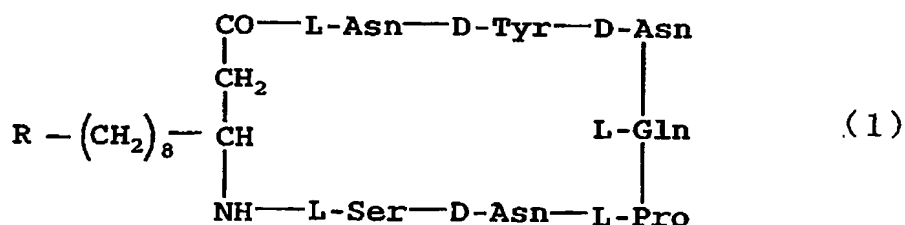
【0003】

アイチュリン A およびその同族体とは次に示す式 1 に記載の構造を有する化合

物群のことを指し、真菌類、特に植物病原菌に対する抗菌作用を持つことから、優れた植物病害防除成分として注目されてきた。

【0004】

【化1】



(Rは炭素数3ないし10の直鎖型または分岐型アルキル基を示す。)

アイチュリンAおよびその同族体の製造方法としては、特許文献1、特許文献2等がある。

【0005】

しかしながら、バチルス (*Bacillus*) 属微生物が生産するアイチュリンAおよびその同族体の生産性は低く、アイチュリンAおよびその同族体もしくはこれらを含む培養物を工業的に利用するために十分な生産性が得られなかったため、多くの研究者によりアイチュリンAおよびその同族体生産性を向上させる努力がなされてきた。畑田らは、バチルス・ズブチリス No. NA-apb-1 株を栄養培地で好氣的に培養し、アイチュリンA系物質を製造する方法を開示している(特許文献3参照。)。この中で窒素源としてペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、コーンスターチリカー、グルテンミール、無機窒素源が教示されており、ペプトン、肉エキス、酵母エキスを含む培地で同株を培養して得られた培養液30LからアイチュリンA 270mgが得られる。Sandrinらは、プロリンを窒素源とした合成培地で480mg/LのアイチュリンAおよびその同族体 that 得られることを開示している(非特許文献2参照。)

。

【0006】

H b i dらは、ペプトンを含む培地でアイチュリンAおよびその同族体収量 1 3 8 8 m g / L が達成される方法を開示している（非特許文献3参照。）。P h a eらは、ペプトンを含む培地でアイチュリンAおよびその同族体収量 6 2 0 m g / L が達成される方法を開示している（非特許文献4参照。）。

【0007】

一方、大豆粉またはその抽出物を含む液体培地でバチルス (B a c i l l u s) 属微生物を培養する方法については、本発明者らにより、サーファクチンの製造法が開示されている（特許文献4参照。）。しかしながら、この公開特許公報にはアイチュリンAおよびその同族体については何も開示されていない。また、特許文献1には1%の大豆粉を含む培地で培養を行い、16Lの培養液から300mgのアイチュリンAおよびその同族体を得られることが開示されているが、アイチュリンAの取得量は公知の培養方法で得られる量とほぼ同等であった。

【0008】

大豆粉またはその抽出物を2質量%以上含む液体培地でアイチュリンAおよびその同族体生産能を有するバチルス (B a c i l l u s) 属微生物を培養することにより培養液中に1.5g/L以上の濃度でアイチュリンAおよびその同族体が蓄積されることはこれまで知られていない。

【0009】

【非特許文献1】

ベッソン (B e s s o n) その他, 「ジャーナル オブ アンチバイオチクス (J o u r n a l o f A n t i b i o t i c s)」, 1978年, 第31巻, p. 284-288

【非特許文献2】

「バイオテクノロジー アンド アプライド バイオケミストリー (B i o t e c h n o l o g y a n d A p p l i e d B i o c h e m i s t r y)」, 1990年, 第12巻, p. 370-375

【非特許文献3】

「アプライド バイオケミストリー アンド バイオテクノロジー (A p p l i e d B i o c h e m i s t r y a n d B i o t e c h n o l o g y

)」, 1996年, 第57/58巻, p. 571-579

【非特許文献4】

「ジャーナル オブ ファーメンテーション アンド バイオエンジニアリング (Journal of Fermentation and Bioengineering)」, 1991年, 第71巻, p. 118-121

【特許文献1】

特開昭59-212416号公報

【特許文献2】

特開平7-143897号公報

【特許文献3】

特公昭63-20519号公報

【特許文献4】

特開2002-176993号公報

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

従来のアイチュリンAおよびその同族体生産性は工業的な利用に供するには十分でなく、さらに生産性を向上させる製造法が望まれていた。本発明は、アイチュリンAおよびその同族体を生産するバチルス属微生物を培養し、培養液中にアイチュリンAおよびその同族体を高濃度に蓄積させるアイチュリンAおよびその同族体の製造方法を提供することを課題の一つとする。また、アイチュリンAおよびその同族体含有培養物、その固形物およびそれらの使用方法を提供することを課題の一つとする。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは上記課題を解決すべく、各種培地成分について鋭意検討を重ねた結果、大豆の粉碎物あるいはその抽出物を窒素源として2質量%以上含有する培地においてアイチュリンAおよびその同族体を生産するバチルス属微生物を培養することにより培養液中にアイチュリンAおよびその同族体が高濃度蓄積されることを見だし、本発明を完成するにいたった。



## 【0012】

すなわち本発明は、例えば、以下のアイチュリンAおよびその同族体の製造法、アイチュリンAおよびその同族体含有培養物、及びアイチュリンAおよびその同族体含有固形物等に関する。

[1] アイチュリンAおよびその同族体生産能を有するバチルス (Bacillus) 属微生物を大豆粉またはその抽出物を2質量%以上含む液体培地で培養し、培養液中に1.5 g/L以上の濃度でアイチュリンAおよびその同族体を蓄積させることを特徴とするアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

## 【0013】

[2] アイチュリンAおよびその同族体生産能を有するバチルス (Bacillus) 属微生物が、1.5 g/L以上のアイチュリンAおよびその同族体を含む培地中で生育可能なバチルス (Bacillus) 属微生物であることを特徴とする [1] に記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

## 【0014】

[3] アイチュリンAおよびその同族体生産能を有するバチルス (Bacillus) 属微生物が、アイチュリンAおよびその同族体生産能を有しサーファクタン生産能を実質的に有さないバチルス (Bacillus) 属微生物であることを特徴とする [1] または [2] に記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

## 【0015】

[4] 液体培地が、リン酸塩の添加量を $K_2HPO_4$ 換算で0~3質量%以下にした液体培地であることを特徴とする [1] ~ [3] のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

## 【0016】

[5] バチルス属微生物がバチルス・ズブチリス (Bacillus subtilis) である [1] ~ [4] のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

## 【0017】

[6] バチルス属微生物がバチルス・ズブチリス SD142 (FERM P-

19032)である[1]～[4]のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【0018】

[7] バチルス属微生物がバチルス・ズブチリス SD142 (FERM P-19032)の変異株である[1]～[4]のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【0019】

[8] 大豆粉またはその抽出物を2質量%以上含む液体培地がマルトース、水飴、可溶性デンプン、デキストリン、グルコース、ショ糖、フルクトースからなる群より選ばれる一種以上を含むものである[1]～[7]のいずれかに記載のアイチュリンAおよびその同族体の製造法。

【0020】

[9] [1]～[8]のいずれかに記載の方法で培養液中にアイチュリンAおよびその同族体を蓄積させたアイチュリンAおよびその同族体含有培養物。

【0021】

[10] [9]に記載のアイチュリンAおよびその同族体含有培養物を乾燥したアイチュリンAおよびその同族体含有固形物。

【0022】

[11] [9]または[10]に記載のアイチュリンAおよびその同族体含有培養物あるいは固形物を使用することを特徴とする植物病害防除剤。

【0023】

[12] [9]または[10]に記載のアイチュリンAおよびその同族体含有培養物あるいは固形物を精製せずに使用することを特徴とする植物病害防除方法。

【0024】

【発明の実施の形態】

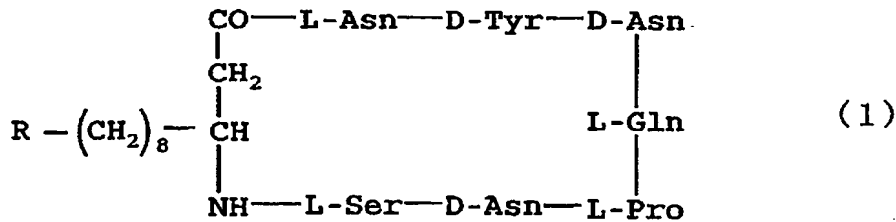
以下、本発明を詳細に説明する。

【0025】

本発明のアイチュリンAおよびその同族体とは、下記式(1)で表される誘導体を意味し、場合によっては、その類縁体も含むものである。

【0026】

【化2】



(Rは炭素数3ないし10の直鎖型または分岐型アルキル基を示す。)

【0027】

本発明によれば、アイチュリンAおよびその同族体を生産する微生物を培養する培地中に窒素源として大豆の粉碎物あるいはその抽出物を2質量%以上添加して培養を行うことにより培養液中に高い濃度でアイチュリンAおよびその同族体を蓄積できる。発明者らの知るところによれば、従来、大豆の粉碎物あるいはその抽出物を窒素源として含む培地でバチルス属微生物を培養することは知られていたが、アイチュリンAおよびその同族体を生産する微生物を大豆の粉碎物あるいはその抽出物を窒素源として2質量%以上含む培地で培養し、培養液中にアイチュリンAおよびその同族体を高い濃度で蓄積するという製造法は知られておらず、本発明者が新規に見いだしたものである。

【0028】

本発明で使用されるバチルス属微生物としては、アイチュリンAおよびその同族体を生産するものであれば特に制限はないが、培地中にアイチュリンAおよびその同族体を高い濃度で蓄積するため、高濃度のアイチュリン存在下で生育できる必要があることから、アイチュリンAおよびその同族体生産能を有し1.5 g/LのアイチュリンAおよびその同族体を含む培地中で生育可能なバチルス (Bacillus) 属微生物が好ましい。また、好ましい他の例として、アイチュリンAおよびその同族体生産能を有しサーファクチン生産能を実質的に有さないバチルス (Bacillus) 属微生物が好ましい。ここで言うサーファク

チン生産能を実質的に有さないとは、大豆の粉碎物あるいはその抽出物を窒素源として含む培地で培養したとき、サーファクチンの蓄積量が 50 ppm 以下であることをいう。アイチュリン A およびその同族体生産能を有し 1.5 g/L のアイチュリン A およびその同族体を含有する培地中で生育可能なバチルス (Bacillus) 属微生物として、例えばバチルス・ズブチリス SD142 (FERM P-19032) が好適である。

#### 【0029】

バチルス・ズブチリス SD142 (FERM P-19032) は堆肥から分離されたものであり、以下の菌学的性質を示す。

#### 【0030】

細菌学的性質 (a) 形態 (1) 細菌の形：桿状 (2) 細菌の大きさ：0.7~0.9 × 1.5~3.0 μm (3) 多形性：なし (4) 運動性：あり (5) 胞子の有無：あり 胞子の形：楕円形あるいは円筒状 (6) グラム染色性：陽性 (7) 抗酸性：陰性 (b) 生育状況 肉汁寒天平板培養：コロニーは円形で大きさは直径 1~2 mm、周縁形は波状、粘性あり、光沢無し。 (c) 生理学的性質 (1) 硝酸塩の還元：陽性 (2) V.P テスト：陽性 (3) インドールの生成：陰性 (4) クエン酸の利用：陽性 (5) コハク酸の利用：陰性 (6) プロピオン酸の利用：陰性 (7) 酒石酸の利用：陰性 (8) ウレアーゼ：陰性 (9) オキシダーゼ：陽性 (10) カタラーゼ：陽性 (11) 生育の範囲：pH 5~9 温度 20~50℃ (12) 10% NaCl 培地：生育 (13) 嫌気培養：陰性 (14) 卵黄反応：陰性 (15) デンプンの加水分解：陽性 (16) アルギニンの分解：陽性 (17) チロシンの分解：陰性 (18) ゼラチンの液化：陽性 (19) エスクリンの分解：陽性 (20) OF テスト：酸化的 (21) グルコースからの酸生成：陰性

#### 【0031】

バチルス・ズブチリス SD142 は、日本国茨城県つくば市東1丁目1番3号 (郵便番号 305-8566) の工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託した (受託番号 FERM P-19032)。

#### 【0032】

また、本発明にはバチルス・ズブチリス SD142 から突然変異によって取得された変異株も好適に使用できる。変異株は自然突然変異株として、平板培地上

のコロニーの形状が変化したものを選抜することによっても得ることができるし、バチルス・ズブチリスSD142に化学的または物理的変異誘発因子を作用させ、アイチュリンAおよびその同族体収量が増加した菌株ストックを作成し、ここから生産能が増大したコロニーを単離することにより得られる。

#### 【0033】

化学的変異誘発物質としては、例えばEMS（エチルメタンスルフォネート）、ジエチルサルフェート、NTG（N-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン）等が使用できる。物理的変異誘発因子としては、変異誘発量の紫外線、ガンマ線、X線等が使用できる。

#### 【0034】

変異菌株ストックを作成する方法としては、例えばNB（Nutrient Broth; Difco Laboratories社製）等の栄養培地で対数増殖期まで生育させたバチルス・ズブチリスを集菌し、洗浄後に生理食塩水に懸濁し、変異誘発量のNTGを添加して変異を誘発し、再度集菌、洗浄してNTGを除去し、再度NB（Difco Laboratories社製）等の栄養培地で培養することにより変異菌株ストックを作成する方法等が挙げられる。

#### 【0035】

生産能が増大したコロニーを単離する方法としては、例えばヒツジ血液を添加したTBAB（Tryptose Blood Agar Base; Difco Laboratories社製）等の培地に寒天を加えて調製した平板培地上に適当に希釈した変異菌株ストックを塗布し、生育したバチルス・ズブチリスのコロニーの周囲に形成されるクリアゾーンの大きさが他より大きいコロニーを選抜することによりアイチュリンAおよびその同族体を高濃度で生産できる突然変異株を選別することができる。

#### 【0036】

ついで、このようにして単離されたバチルス・ズブチリスの変異株のアイチュリンAおよびその同族体生産性を、コントロールとしてバチルス・ズブチリスSD142を使用し、試験管培養により確認することができる。

#### 【0037】

以下、本発明のアイチュリンAおよびその同族体の製造法を説明する。本発明のアイチュリンAおよびその同族体の製造法は、最も簡便には、例えばバチルス・ズブチリスSD142を、L培地等の栄養培地で、25～42℃、好ましくは28～38℃の温度で5～24時間程度培養し、得られた培養液を大豆粉あるいはその抽出物を窒素源として含む培地に0.1～10質量%、好ましくは0.5～7質量%、より好ましくは1～5質量%植菌する。これを25～42℃、好ましくは28～35℃の温度で30～150時間程度培養することにより達せられる。上記温度範囲を外れた場合にはアイチュリンAおよびその同族体の生産が著しく低下するため、好ましくない。

#### 【0038】

本発明において大豆粉あるいはその抽出物とは、大豆または脱脂大豆を顆粒状に粉碎した粗粒大豆粉、粉末状に粉碎した粉碎大豆粉、それらの抽出物（例えば熱水抽出物）、加水分解物（例えば酸加水分解物、酵素加水分解物）等のことを言う。大豆粉あるいはその抽出物の濃度は2質量%以上が望ましい。しかし、一方で大豆粉あるいはその抽出物が高濃度になると滅菌が不十分になるおそれがあるので、20質量%濃度を超えないことが望ましい。よって高い生産量を得るための大豆粉あるいはその抽出物濃度は2～20質量%であり、好ましくは3～17質量%、より好ましくは4～14質量%である。

#### 【0039】

本発明に使用する培地には、大豆粉あるいはその抽出物の他に、通常使用する異化可能な炭素源、窒素源及び無機塩等を含有させることができる。さらに必要であればアミノ酸および／またはビタミン等を添加することができる。

#### 【0040】

異化可能な炭素源としては、グルコース、マルトース、ショ糖、フルクトース、可溶性デンプン、水飴、デキストリン、糖蜜、馬鈴薯エキス、モルト、ピート、植物油、コーンステープリカー、フルクトース、シロップ、糖質（sugar）、液糖（liquid sugar）、転化糖（invert sugar）、アルコール、有機酸、有機酸塩、アルカンまたは他の一般的な炭素源が利用でき、単独、あるいはこれらを組み合わせて使用することができ、これらのなか

でもマルトース、可溶性デンプン、水飴、デキストリンが好ましい。これらは通常0.01～50質量%、好ましくは1～40質量%程度の濃度で用いることができる。

#### 【0041】

また、異化可能な窒素源としては、たとえば硝酸アンモニウム、硫酸アンモニウム、塩化アンモニウム、酢酸アンモニウム、炭酸アンモニウムまたは重炭酸アンモニウム等のアンモニウム塩、アンモニア、硝酸ナトリウム、硝酸カリウム、グルタミン酸ナトリウム、尿素、ペプトン、肉エキス、コーンステープリカー、カゼイン水解物、フェザーミール、酵母エキス等の無機または有機窒素を含有するものが利用でき、これらを単独、あるいは組み合わせて使用することができ、これらを通常0.01～30質量%、好ましくは0.1～10質量%程度の濃度で用いるのがよい。

#### 【0042】

さらに、無機成分として、カリウムイオン、ナトリウムイオン、マグネシウムイオン、リン酸イオン、鉄イオン、マンガンイオン、カルシウムイオン、亜鉛イオン、コバルトイオン、ニッケルイオン、銅イオン、モリブデンイオン、硫酸イオン、塩化物イオンまたは硝酸イオン等のカチオンまたはアニオンを添加することができる。添加濃度は培養条件により異なるが、通常、マグネシウム塩として10ppm～2質量%、リン酸塩以外の他の塩は0.1ppm～1000ppm程度である。リン酸イオンはリン酸塩として添加することができるが、添加濃度が $K_2HPO_4$ 換算で3質量%より高いとアイチュリンAおよびその同族体の蓄積濃度が低下するため、3質量%以下であることが好ましく、さらに好ましくはリン酸イオンを添加しない培地が好ましい。

#### 【0043】

また、添加するアミノ酸としては、L-グリシン、L-アラニン、L-バリン、L-ロイシン、L-イソロイシン、L-セリン、L-トレオニン、L-フェニルアラニン、L-チロシン、L-システイン、シスチン、L-メチオニン、L-トリプトファン、L-ヒスチジン、L-プロリン、L-アスパラギン酸、L-アスパラギン、L-グルタミン酸、L-グルタミン、L-アルギニン、L-リシン

、D-バリン、D-イソロイシン等が挙げられ、これらを1種または2種以上添加することができる。添加濃度は0.001～5質量%、好ましくは0.01～1質量%程度である。

#### 【0044】

ビタミンとしてはビオチン、チアミン、リボフラビン、ピリドキシン、ニコチン酸、ニコチン酸アミド、パントテン酸、ピリドキサール、ピリドキシン、myo-イノシトール、コリン、葉酸、コバラミン、シアノコバラミン等を1種または2種以上添加することができる。添加濃度は0.1～100ppmであり、好ましくは1～50ppmである。

#### 【0045】

本発明における培養では、試験管、フラスコ、発酵槽等の容器に上記の培地を添加し、強く通気しながら、培養を行う。

#### 【0046】

試験管、フラスコ等の容器を用いた培養の場合は強く振とうすることにより通気を行い、培地の初発のpHを6.5～8.0に調整する。発酵槽等の容器により高濃度の生産を行う場合は無菌空気を通気し、攪拌しながら培養を行い、発泡があつて培養が困難な場合は通常使用される一般的な消泡剤を添加することができる。

#### 【0047】

培地のpHは6.0～9.0、好ましくは6.5～8.0、より好ましくは6.8～7.3に維持する。pHの調節はたとえば、アンモニア水溶液、水酸化カリウム水溶液、水酸化ナトリウム水溶液、炭酸ナトリウム水溶液または炭酸カリウム水溶液等の塩基性水溶液の添加によって行うが、それらの中でもアンモニア水溶液を使用することが好ましい。アンモニア水溶液の濃度は8～25質量%程度がよい。このような培養を好適な条件下で行うことにより、30～150時間でアイチュリンAおよびその同族体を1.5g/L以上の濃度で含むアイチュリンAおよびその同族体含有培養物が得られる。

#### 【0048】

上記培養物を凍結乾燥、噴霧乾燥等の既知の方法で乾燥することにより、アイ



チュリンAおよびその同族体含有固形物を得ることができる。これらのアイチュリンAおよびその同族体含有培養物及びアイチュリンAおよびその同族体含有固形物は、農地の土壤に施用したり、あるいは農作物の葉面に散布したりすることにより、植物病害を防除する効果が得られ、有用である。従ってこれらのアイチュリンAおよびその同族体含有培養物及びアイチュリンAおよびその同族体含有固形物もまた本発明に含まれる。また、アイチュリンAおよびその同族体含有培養物からアイチュリンAおよびその同族体を回収し、精製することができる。精製は例えば培養物を硫酸、塩酸、硝酸等の添加により酸性にし、沈殿したアイチュリンAおよびその同族体をメタノール、エタノール、クロロホルム等の有機溶媒による抽出、活性炭処理、結晶化等の公知の方法で行うことができる。

#### 【0049】

本発明により得られたアイチュリンAおよびその同族体は、植物病害防除剤の他、例えば、洗浄剤、乳化剤、湿潤剤、分散剤、可溶化剤、帯電防止剤、防曇剤、滑剤等の分野に用いることができ、化粧品、食品、医薬品、農薬等に有効である。

#### 【0050】

##### 【実施例】

以下、実施例により本発明をさらに詳しく説明するが、本発明はこれら実施例によりなんら限定されるものではない。

#### 【0051】

##### <バチルス・ズブチリスSD142の変異株の取得例1>

バチルス・ズブチリスSD142を、L培地（ペプトン10g、酵母エキス5g、塩化ナトリウム5g、水で1Lとする）5mlに植菌し、35℃、300rpmで16時間培養した。ついで、同培地5mlに、得られた培養液を1v/v%植菌し、35℃、300rpmでOD660が0.2となるまで培養した。その後、菌体を遠心分離により回収し、上清を捨て、PBS緩衝液（0.8w/v%NaCl、0.02w/vw/v%KCl、0.144w/v%Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、0.024w/v%KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、HClでpH7.4に調製）5mlで3回洗浄し、同緩衝液0.5mlに再度懸濁した。

## 【0052】

2000 ppmのN-メチル-N'-ニトロ-N-ニトロソグアニジン水溶液 0.05 ml を懸濁液に添加し、30℃で10分間静置した。懸濁液を遠心分離し、上清を捨て、菌体を同緩衝液 5 ml で3回洗浄し、新たなL培地 1 ml 中に再度懸濁した。懸濁液を、テトラサイクリンを10 ppm添加したL培地 4 ml に添加し、35℃で一晩生育させた後、50質量%グリセリン水溶液 2.5 ml を添加し、凍結保存用バイアルに少量ずつ分注し、-135℃で凍結させ、形質転換体保存ストックとした。

## 【0053】

ついで、5 w/v %ヒツジ血液、4 w/v %グルコース、0.1 w/v %NB (Difco Laboratories社製)、0.1 w/v %酵母エキスを 含む寒天平板培地 (Cooperら、Applied Environmental Microbiology, 42:408~412 (1981)) 50000 プレートに、約200コロニー/プレートとなるように滅菌水で希釈した形質転換体保存ストックを塗布した。35℃で20~48時間インキュベートした後、生育したコロニーの周囲に形成されたクリアゾーンを観察し、大きいクリアゾーンを形成するコロニーを50000コロニー選抜した。

## 【0054】

バチルス・ズブチリスSD142および得られた50000コロニーをL平板培地に画線し、35℃で一晩生育させた。下記組成Aの培地 1 ml を試験管に分注し、L平板培地から1白金耳をとり植菌し、35℃で72時間培養を行った。

## 【0055】

[組成A] (質量%)

大豆粉	8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.0025
MnSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0022
CaCl <sub>2</sub>	0.0184

マルトース

6. 7

残部はイオン交換水である。

**【0056】**

培養液を遠心分離し、上清に含まれるアイチュリンAおよびその同族体を以下の条件によるHPLC法により定量した。

サンプル量: 10  $\mu$ l

カラム: Shodex $\alpha$ シリカC18P4E、4.6mm $\times$ 250mm、昭和電工株式会社製

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

溶離液: アセトニトリル: 10mM酢酸アンモニウム水溶液 = 35:75 (v/v)

流速: 1.5ml/min

検出器: UV検出器

波長: 205nm

定量はアイチュリンAおよびその同族体の標準サンプル（シグマアルドリッチ社製）を用いて検量線を作成して測定した。

**【0057】**

アイチュリンAおよびその同族体の蓄積濃度がバチルス・ズブチリスSD142より向上したアイチュリンAおよびその同族体高生産変異株（変異株1）を取得した。

**【0058】**

<バチルス・ズブチリスSD142の変異株の取得例2>

取得例1の培養上清中のサーファクチン濃度を以下の条件によるHPLC法により定量した。

サンプル量: 20  $\mu$ l

カラム: Shodex $\alpha$ シリカC18P4E、4.6mm $\times$ 250mm、昭和電工株式会社製

カラム温度: 40 $^{\circ}$ C

溶離液: アセトニトリル: 19mM トリフルオロ酢酸水溶液 = 80:20 (v/v)

／v)

流速: 1.0 ml/min

検出器: UV検出器

波長: 205 nm

定量はサーファクチンの標準サンプル（シグマールドリッチ社製）を用いて検量線を作成して測定した。

#### 【0059】

上記条件で検出されず、サーファクチン蓄積濃度が50 ppm以下である実質的にサーファクチン非生産の変異株（変異株2）を取得した。

#### 【0060】

<実施例1>: 試験管培養におけるアイチュリンAおよびその同族体の生産に対する窒素源の効果

バチルス・ズブチリスSD142をL平板培地に画線し、35℃で一晩生育させた。下記組成Bの培地1mlを試験管に分注し、L平板培地から1白金耳を取り植菌し、35℃で72時間培養を行った。

#### 【0061】

[組成B] (質量%)

K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0025
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0022
CaCl <sub>2</sub>	0.0184
マルトース	6.7

以上の組成に窒素源として以下のうちの1つを2質量%添加

大豆粉

硝酸カリウム

硝酸アンモニウム

硫酸アンモニウム

尿素

グルタミン酸ナトリウム

ペプトン

残部はイオン交換水である。

【0062】

培養液を遠心分離し、上清に含まれるアイチュリンAおよびその同族体をHPLC法により定量した。

【0063】

各窒素源に対するアイチュリンAおよびその同族体の蓄積濃度は以下の通りであった。

大豆粉	1.5 g/L
硝酸カリウム	0.03 g/L
硝酸アンモニウム	0.03 g/L
硫酸アンモニウム	0.03 g/L
尿素	0.03 g/L
グルタミン酸ナトリウム	0.1 g/L
ペプトン	0.15 g/L

【0064】

<実施例2>:試験管培養におけるアイチュリンAおよびその同族体の生産に対する大豆粉濃度の効果

バチルス・ズブチリスSD142をL平板培地に画線し、35℃で一晩生育させた。下記組成C、DおよびEの培地各1mlを試験管に分注し、L平板培地から1白金耳をとり植菌し、35℃で72時間培養を行った。

【0065】

[組成C] (質量%)

大豆粉	1
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0025
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0022

$\text{CaCl}_2$	0.0184
マルトース	6.7

残部はイオン交換水である。

【0066】

[組成D] (質量%)

大豆粉	2
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0025
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0022
$\text{CaCl}_2$	0.0184
マルトース	6.7

残部はイオン交換水である。

【0067】

[組成性E] (質量%)

大豆粉	8
$\text{K}_2\text{HPO}_4$	0.5
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.05
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.0025
$\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0022
$\text{CaCl}_2$	0.0184
マルトース	6.7

残部はイオン交換水である。

【0068】

培養液を遠心分離し、上清に含まれるアイチュリンAおよびその同族体をHPLC法により定量した。各培地に対するアイチュリンAおよびその同族体量は以下の通りであった。

組成C: 0.3 g/L

組成D: 1.5 g/L

組成 E: 3.8 g/L

【0069】

<実施例 3>: 試験管培養におけるアイチュリン A およびその同族体の生産に対する炭素源の効果

バチルス・ズブチリス SD142 を L 平板培地に画線し、35℃で一晩生育させた。下記組成 F に下記の炭素源を添加した培地各 1 ml を試験管に分注し、L 平板培地から 1 白金耳をとり植菌し、35℃で 72 時間培養を行った。

【0070】

[組成 F] (質量%)

大豆粉	8
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.05
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.0025
MnSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	0.0022
CaCl <sub>2</sub>	0.0184

以上の組成に窒素源として以下のうちの 1 つを 6.7 質量% 添加

マルトース  
可溶性デンプン  
水飴  
デキストリン  
グルコース  
ショ糖  
フルクトース

残部はイオン交換水である。

【0071】

培養液を遠心分離し、上清に含まれるアイチュリン A およびその同族体を HPLC 法により定量した。各炭素源に対するアイチュリン A およびその同族体の蓄積濃度は以下の通りであった。

マルトース 3.8 g/L

可溶性デンプン	3.8 g/L
水飴	3.8 g/L
デキストリン	3.8 g/L
グルコース	2.8 g/L
ショ糖	2.2 g/L
フルクトース	2.3 g/L

## 【0072】

<実施例4>:試験管培養におけるアイチュリンAおよびその同族体の生産に対するリン酸塩の効果

バチルス・ズブチリスSD142をL平板培地に画線し、35℃で一晩生育させた。下記組成Gに下記の濃度の $K_2HPO_4$ を添加した培地各1mlを試験管に分注し、L平板培地から1白金耳をとり植菌し、35℃で72時間培養を行った。

## 【0073】

[組成G] (質量%)

大豆粉	8
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.05
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.0025
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.0022
$CaCl_2$	0.0184
マルトース	6.7

以上の組成に $K_2HPO_4$ を以下の濃度になるように添加

- 0 質量% (添加せず。)
- 0.1 質量%
- 0.5 質量%
- 1.5 質量%
- 3.0 質量%
- 4.5 質量%

残部は、イオン交換水である。



## 【0074】

炭酸ナトリウムでpH7になるように調製後、培養液を遠心分離し、上清に含まれるアイチュリンAおよびその同族体をHPLC法により定量した。各 $K_2HPO_4$ 濃度に対するアイチュリンAおよびその同族体の蓄積濃度は以下の通りであった。

## 【0075】

0 質量%	3.8 g/L
0.1 質量%	3.6 g/L
0.5 質量%	3.5 g/L
1.5 質量%	3.0 g/L
3.0 質量%	2.2 g/L
4.5 質量%	1.5 g/L

## 【0076】

<実施例5>：発酵槽におけるアイチュリンAおよびその同族体の生産

バチルス・ズブチリスSD142、変異株1および変異株2をL平板培地に画線し、35℃で一晩生育させた。そこからL培地50mlを添加したバッフル付きフラスコに1白金耳植菌し、35℃、150rpmで8時間培養した。下記組成Hの培地を5L容の発酵槽に作成し、L培地の培養液を添加し、20%アンモニア水でpHを6.5~7.5に調整しながら35℃で150時間培養を行った。

## 【0077】

[組成H]

大豆粉	160 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	5 g
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.25 g
$MnSO_4 \cdot 5H_2O$	0.22 g
$CaCl_2$	1.84 g
水飴	4.50 g
イオン交換水	1383 g

## 【0078】

培養液を遠心分離した上清に含まれるアイチュリンAおよびその同族体をHPLC法により定量した。アイチュリンAおよびその同族体量は以下の通りであった。

バチルス・ズブチリスSD142	3.8 g/L
変異株1	6.7 g/L
変異株2	6.7 g/L

この結果より、これらの菌株はいずれも1.5 g/L以上のアイチュリン存在下で生育できることが明らかである。

## 【0079】

## 【発明の効果】

本発明によれば、医薬品、農薬、食品、化粧品、化学品等の幅広い様々な産業分野において有用なアイチュリンAおよびその同族体を安価な培地原料を用いて従来の方法に比較して飛躍的に高濃度で生産することができる。

## 【0080】

また、農薬、植物病害防除の分野においては、培養液中にアイチュリンAおよびその同族体を高濃度で生産できるため、これまで、培養液そのままでは濃度の不足していた用途に培養液をそのまま使用することも可能となる。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来のアイチュリンAおよびその同族体生産性は工業的な利用に供するには十分でなく、さらに生産性を向上させる製造法が望まれていた。本発明は、アイチュリンAおよびその同族体を生産するバチルス属微生物を培養し、培養液中にアイチュリンAおよびその同族体を高濃度に蓄積させるアイチュリンAおよびその同族体の製造方法を提供することを課題の一つとする。また、アイチュリンAおよびその同族体含有培養物、その固形物およびそれらの使用方法を提供することを課題のとする。

【解決手段】 本発明者らは上記課題を解決すべく、各種培地成分について鋭意検討を重ねた結果、大豆の粉碎物あるいはその抽出物を窒素源として2質量%以上含有する培地においてアイチュリンAおよびその同族体を生産するバチルス属微生物を培養することにより培養液中にアイチュリンAおよびその同族体が高濃度蓄積されることを見だし、本発明を完成するにいたった。

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2002-277873
受付番号	50201425798
書類名	特許願
担当官	第二担当上席 0091
作成日	平成14年 9月30日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成14年 9月24日
-------	-------------

次頁無

特願 2002-277873

出願人履歴情報

識別番号

[000002004]

1. 変更年月日

1990年 8月27日

[変更理由]

新規登録

住 所

東京都港区芝大門1丁目13番9号

氏 名

昭和電工株式会社